

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/002059

International filing date: 10 February 2005 (10.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-049303  
Filing date: 25 February 2004 (25.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 07 April 2005 (07.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

15.02.2005

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 4 年   2 月 2 5 日  
Date of Application:

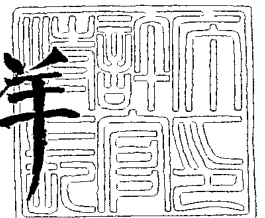
出 願 番 号            特 願 2 0 0 4 - 0 4 9 3 0 3  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 4 - 0 4 9 3 0 3 ]

出      願      人            独 立 行 政 法 人 科 学 技 術 振 興 機 構  
Applicant(s):

2 0 0 5 年   3 月 2 5 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川 洋

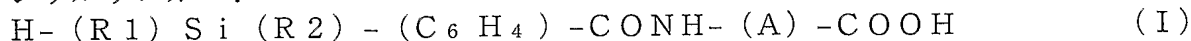


【書類名】 特許願  
【整理番号】 AB04012J  
【あて先】 特許庁長官殿  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区あざみ野 1 - 2 6 - 4 6  
    【氏名】 関根 光雄  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区しらとり台 4 8 - 5 第 2 パークサイド内  
    田 1 0 2  
    【氏名】 清尾 康志  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都町田市小川 1 - 1 0 - 5 - 2 0 2  
    【氏名】 大窪 章寛  
【特許出願人】  
    【識別番号】 503360115  
    【氏名又は名称】 独立行政法人 科学技術振興機構  
【代理人】  
    【識別番号】 100100181  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 阿部 正博  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 053419  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 0316565

## 【書類名】特許請求の範囲

## 【請求項 1】

以下の一般式 (I) で示される化合物又はその塩若しくはエステルである核酸固相合成用シリルリンカー:



(式中、R1 及び R2 は、アルキル基又はアリール基であり、(A) はスペーサー部位を示す)。

## 【請求項 2】

スペーサー部位 (A) が、 $-(\text{CH}_2)_n-$  (n は自然数を示す) で示されるアルキレン基である、請求項 1 記載の化合物。

## 【請求項 3】

n が 2 ~ 18 である、請求項 2 記載の化合物。

## 【請求項 4】

アルキレン基中に、少なくとも一つのエーテル結合又はチオエーテル結合を有する、請求項 2 又は 3 に記載の化合物。

## 【請求項 5】

R1 及び R2 が炭素原子数が 1 ~ 5 を有するアルキル基である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の化合物。

## 【請求項 6】

R1 及び R2 のアリール基が、アルキル基、ニトロ基、シアノ基、ハロゲノ基、又はメトキシ基で置換されている、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の化合物。

## 【請求項 7】

ベンゼン環骨格が置換基を有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の化合物。

## 【請求項 8】

ベンゼン環骨格が置換基が炭素原子数が 1 ~ 4 を有するアルキル基、ハロゲノ基、ニトロ基、シアノ基、及びメトキシ基から成る群から選択される、請求項 7 記載の化合物。

## 【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の化合物がヌクレオシド又はその誘導体の糖の 3 位に酸素原子を介して結合して成る、3' 末端ヌクレオシドユニット。

## 【請求項 10】

ヌクレオシドを構成する塩基がチミンである、請求項 9 記載の 3' 末端ヌクレオシドユニット。

## 【請求項 11】

5' -O-(4,4' -ジメトキシトリチル)-チミジン-3' -O-ジイソプロピルシリル-4-ベンゾイルアミノブタン酸トリエチルアンモニウムである請求項 10 記載の化合物。

## 【請求項 12】

請求項 9 記載の 3' 末端ヌクレオシドユニットが導入されている固相担体。

## 【請求項 13】

3' 末端ヌクレオシドユニットが 20 ~ 30  $\mu\text{mol/g}$  の割合で導入されている、請求項 12 記載の固相担体。

## 【請求項 14】

HCP 固相担体である、請求項 12 又は 13 記載の固相担体。

## 【請求項 15】

請求項 12、13 又は 14 に記載の固相担体を用いる、核酸オリゴマーの合成方法。

## 【請求項 16】

核酸オリゴマーが修飾塩基を含むものである、請求項 15 記載の合成方法。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】核酸固相合成用シリルリンカー

## 【技術分野】

【0001】

本発明は、DNA合成に用いる固相担体に効率よく導入できるシリルリンカーに関する。

## 【背景技術】

【0002】

核酸関連研究の多様化が進む中で、酸化損傷DNAオリゴマーや塩基性条件下で不安定な官能基をもつDNAオリゴマーなど通常のDNA合成で用いる塩基性条件（アンモニア処理）では分解してしまう機能性分子の迅速かつ高純度な合成が望まれている。

【0003】

これまでに、中性条件で切り出しができるシリルリンカーとして、本発明者の一人である関根が開発した安息香酸型化合物である  $iP_2Si-C_6H_4-C(=O)-$  型のものが知られていた（非特許文献1）。しかし、これは固相担体への導入にほぼ1日もの長い時間を要し、又、その導入効率も、特にアミノ基総量が少ないHCP固相（ $34 \mu mol/g$ ）への導入の場合には極めて低く（ $6-8 \mu mol/g$ ）、実用性の点で十分ではなかった。

【0004】

【非特許文献1】Kobori, A.; Miyata, K.; Ushioda, M.; Seio, K.; Sekine, M., Chemistry Letters, 2002, 16-17

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

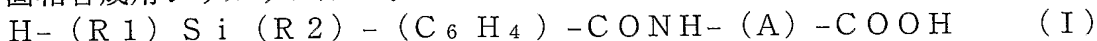
【0005】

従って、本発明は、固相担体に効率よく導入できるシリルリンカーを開発することを目的とする。発明者は鋭意研究の結果、従来のシリルリンカーにさらにスペーサーを導入することによってこの課題を解決し、本発明を完成した。

## 【課題を解決するための手段】

【0006】

即ち、本発明は、以下の一般式（I）で示される化合物又はその塩若しくはである核酸固相合成用シリルリンカー：



（式中、R1及びR2は、アルキル基又はアリール基であり、（A）はスペーサー部位を示す）

に係る。

【0007】

更に、本発明は、上記化合物がヌクレオシド又はその誘導体（例えば、糖の5位水酸基が適当な保護基で保護されているもの等）の糖の3位に酸素原子を介して結合して成る、3'末端ヌクレオシドユニットに係る。特に、ヌクレオシドを構成する塩基がチミンである場合には、アミノ基がないので、固相への導入時に保護する必要がないので有利である。

【0008】

又、本発明はこの3'末端ヌクレオシドユニット又は核酸固相合成用シリルリンカーが導入されている、当業者に公知の任意の固相担体、特にHCP固相担体に係るものである。又、本発明の固相担体を用いる核酸オリゴマーの合成方法にも係る。この方法は、特に、アセチル化シトシンのような塩基性条件下では不安定な修飾塩基を含む核酸オリゴマーの合成に有利である。

## 【発明の効果】

【0009】

本発明の新規シリルリンカーは中性条件で切り出しができ、更に、3'末端ヌクレオシドユニットの固相担体への導入量を、DNA合成において最適とされていた $20-30 \mu mol/g$ 程度に飛躍的に向上することができた。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0010】

本発明化合物におけるスペーサー部位 (A) としては、所望の目的を達成することができる限り、当業者に公知の任意のものを使用することが出来る。例えば、一般式 (I I) :

$$-(CH_2)_n- \quad (I I)$$

(式中、 $n$  は自然数、好ましくは 2 ~ 18 を示す) で示されるアルキレン基を挙げることが出来る。アルキレン基中に、少なくとも一つのほかの基、例えば、エーテル結合又はチオエーテル結合を有することも可能である。

## 【0011】

シリル基上には当業者に公知の任意の置換基である  $R_1$  及び  $R_2$  があってもよく、例えば、炭素原子数が 1 ~ 5 を有するアルキル基、又は、任意の位置で、該アルキル基、ニトロ基、シアノ基、ハロゲン基、又はアルコキシ基で置換されていても良い、ベンジル基、フェニル基、及びナフチル基のようなアリール基を挙げることが出来る。

## 【0012】

更に、本発明化合物のベンゼン環骨格が当業者に公知の任意の置換基を有するものであっても良い。かかる置換基の例としては、炭素原子数が 1 ~ 4 を有するアルキル基、ハロゲン基、ニトロ基、シアノ基、及びメトキシ基から成る群から選択される。尚、 $-CONH-$  と  $Si$  はベンゼン環骨格にパラの位置で結合している。

## 【0013】

本発明化合物の塩若しくはエステルとしては当業者に公知の任意のものから選択することができ、例えば、トリエチルアンモニウム塩、トリブチルアンモニウム塩、及びエチルジイソプロピルアンモニウム塩等の塩、並びに、シアノエチルエステル、アリルエステル、及び 4-ニトロフェニルエチルエステル等のエステルを挙げることが出来る。

## 【0014】

本発明の化合物は、本明細書、特に以下の実施例の記載等を参照することによって、当業者であれば容易に合成することが出来る。また、本明細書に記載されていない諸条件は当業者が適宜選択することができる。

## 【実施例】

## 【0015】

以下、実施例に則して本発明を更に詳しく説明する。尚、本発明の技術的範囲は以下の実施例によって何ら制限されるものではない。

## 【0016】

実施例 1 : シリルリンカーの合成

4-ジイソプロピルシラニルベンゾイルクロライド (2)

4-ジイソプロピルシラニル安息香酸 1 (6.7 g, 28.4 mmol) と塩化チオニル (3.2 mL, 42.6 mmol) を混合し、2時間加熱還流を行った。その後、目的物を減圧蒸留 (1mmHg, 102 ~ 104°C) により単離精製した (5.6 g, 77 %)。この NMR データは以下のとおりである。

## 【0017】

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ): 0.95-1.06 (m, 12H), 1.21-1.29 (m, 2H), 3.99 (t, 1H,  $J = 3.1$  Hz), 7.64 (d, 2H,  $J = 7.8$  Hz), 8.03 (d, 2H,  $J = 7.8$  Hz).

$^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ ): 10.7, 18.5, 18.7, 130.0, 133.6, 135.9, 144.5, 168.3.

## 【0018】

4-[4-(ジイソプロピルシラニル)ベンゾイルアミノ]ブタン酸 (3)

4-アミノブタン酸 (910 mg, 8.94 mmol) を溶解させた 1N 水酸化ナトリウム水溶液 (9 mL) に、ジイソプロピルシラニルベンゾイルクロライド 2 (1.7 g, 6.7 mmol) を加え、8時間攪拌をおこなった。続いて、この水溶液に 12N 塩酸を pH が 2 になるまで加え、400 mL の  $CH_2Cl_2$  を用いて抽出、有機層を回収した。この有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、溶媒を減圧留去させた。目的物の単離精製はシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて行った。クロロホルムに 0-3% メタノールのグラジエントをかけて溶出し、溶媒を留去し目的の白色個体を得た (1.4 g, 65 %)。この NMR データは以下のとおりである。

## 【0019】

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.93-1.06 (m, 12H), 1.16-1.25 (m, 2H), 1.94 (t, 2H,  $J = 4.1$  Hz), 2.45 (t, 2H,  $J = 6.9$  Hz), 3.50 (dd, 2H,  $J = 6.5$  Hz,  $J = 9.7$  Hz), 3.93 (t, 1H,  $J = 3.1$  Hz), 6.77 (brs, 1H), 7.54 (d, 2H,  $J = 8.1$  Hz), 7.72 (d, 2H,  $J = 8.1$  Hz).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 10.5, 17.9, 18.3, 18.4, 24.3, 31.6, 39.5, 57.9, 77.2, 125.8, 134.3, 135.3, 138.6, 168.3, 176.6.

## 【0020】

4-[4- (ジイソプロピルシラニル) ベンゾイルアミノ] ブタン酸 2-シアノエチルエステル (4)

4-[4- (ジイソプロピルシラニル) ベンゾイルアミノ] ブタン酸 3 (1.3 g, 4.1 mmol) と2-シアノエタノール (548  $\mu\text{L}$ , 8.1 mmol)、トリエチルアミン (828  $\mu\text{L}$ , 6.1 mmol) を溶解させたピリジン溶液 (20 mL) に縮合剤N,N-ビス (2-オキソ-3-オキサゾリジニル)-ホスフィン酸クロリド BOP-Cl (1.5 g, 6.1 mmol) を加える。室温で3時間攪拌後、水 (5 mL) を加える。5分後、クロロホルム (200 mL) で希釈後、5wt%-炭酸水素ナトリウム水溶液150mlで3回抽出操作を行った。さらに、有機層を回収し無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、溶媒を減圧留去させる。この粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、クロロホルムに0-3%メタノールのグラジエントをかけて溶出し、溶媒を留去し目的物を得た (1.2 g, 79%)。このNMRデータは以下のとおりである。

## 【0021】

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.89-1.00 (m, 12H), 1.15-1.21 (m, 2H), 1.89 (t, 2H,  $J = 6.9$  Hz), 2.40 (t, 2H,  $J = 7.0$  Hz), 2.62 (t, 2H,  $J = 6.2$  Hz), 3.42 (dd, 2H,  $J = 6.6$  Hz,  $J = 12.8$  Hz), 3.89 (t, 1H,  $J = 3.0$  Hz), 4.18 (t, 2H,  $J = 6.2$  Hz), 6.99 (brs, 1H), 7.49 (d, 2H,  $J = 7.6$  Hz), 7.72 (d, 2H,  $J = 7.8$  Hz).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 10.4, 17.8, 18.3, 18.4, 24.4, 31.2, 39.1, 58.5, 77.2, 116.7, 125.7, 134.7, 135.3, 138.4, 167.4, 172.4.

## 【0022】

5' -O-(4,4' -ジメトキシトリチル)-チミジン-3' -O-ジイソプロピルシリル-4-ベンゾイルアミノブタン酸トリエチルアンモニウム (6)

4-[4- (ジイソプロピルシラニル) ベンゾイルアミノ] ブタン酸 2-シアノエチルエステル4 (1.1 g, 2.9 mmol) を無水 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  15mLに溶解し、1,3-ジクロロ-4,4-ジメチルヒダントイン (1.2 g, 5.9 mmol) を加える。室温30分の攪拌の後、この反応溶液を5' -O-(4,4' -ジメトキシトリチル)チミジン (3.2 g, 5.9 mmol) とイミダゾール (2.0 g, 29.4 mmol) を溶解させた無水 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  10mLに加える。室温で30分攪拌後、水 (5 mL) を加える。5分後、クロロホルム (100 mL) で希釈後、5wt%-炭酸水素ナトリウム水溶液100mlで3回抽出操作を行った。さらに、有機層を回収し無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、溶媒を減圧留去させる。この粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1%ピリジン) により精製し、ヘキサンに30-100%クロロホルムのグラジエントをかけて溶出し、溶媒を留去した。その後、アセトニトリル30 mLに溶解し、DBU (1.7 mL, 11.2 mmol) を加えて、室温で30分間攪拌した。その後、0.5 Mの炭酸トリエチルアンモニウムバッファー100 mLを加え、クロロホルム100 mLで抽出を行った。さらに、有機層を回収し無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、溶媒を減圧留去させる。この粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、クロロホルムに1%のトリエチルアミンを混合し、0-3%メタノールのグラジエントをかけて溶出し、溶媒を留去し目的物を得た (1.5 g, 54%)。このNMRデータは以下のとおりである。

## 【0023】

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.92-1.08 (m, 12H), 1.18-1.30 (m, 11H), 1.49 (s, 3H), 1.93 (t, 2H,  $J = 6.3$  Hz), 2.35-2.47 (m, 4H), 3.42 (d, 2H,  $J = 7.3$  Hz), 3.45-3.75 (m, 8H), 3.78 (s, 6H), 4.14 (s, 1H), 4.64 (s, 1H), 6.44 (t, 1H,  $J = 6.8$  Hz), 6.80 (d, 4H,  $J = 7.6$  Hz), 7.18-7.80 (m, 14H).

## 【0024】

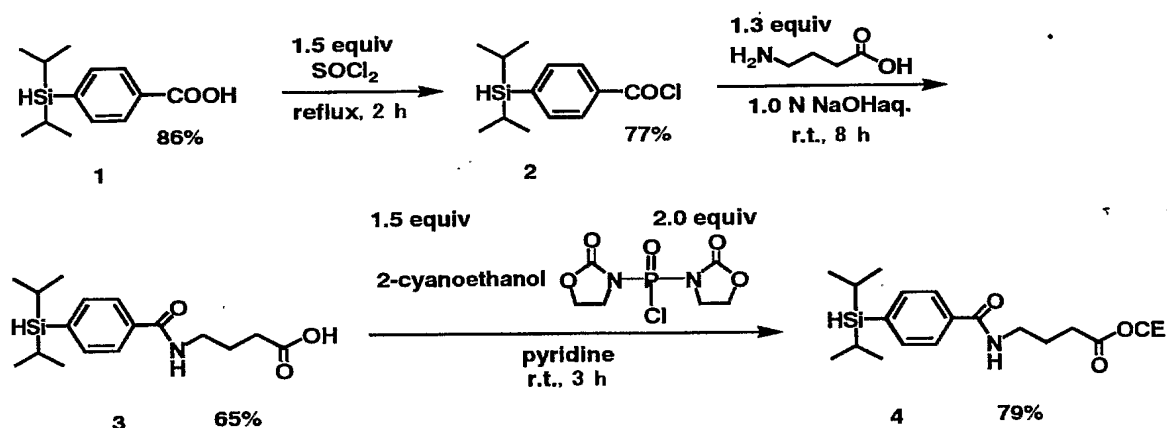
## 実施例 2: 固相担体 (7) の調製

十分乾燥させたハイリークロスリンクポリスチレン (HCP) 固相担体 (500mg 52  $\mu$ mol)、5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)、3'-O-(ジイソプロピルシリル-4-ベンゾイルアミノブタン酸トリエチルアンモニウム)チミジン3-9 (260  $\mu$ mol)そしてDCC (268 1.3mmol)をジクロロメタン (5 mL)に溶かし、室温12時間攪拌する。反応後、固相担体をろ過し、アセトニトリルでの洗浄・乾燥を行った後、無水酢酸 (0.5ml)とDMAP (5 mg)をピリジン (4.5 mL)に溶かした溶液に加える。3時間攪拌を行った後、固相担体を再度ろ過し、アセトニトリルで洗浄した。固相担体への導入量は、トリチル基の比色定量より求めた(21  $\mu$ mol/g)。

以上の各合成ステップを以下の化1及び化2にまとめて示した。

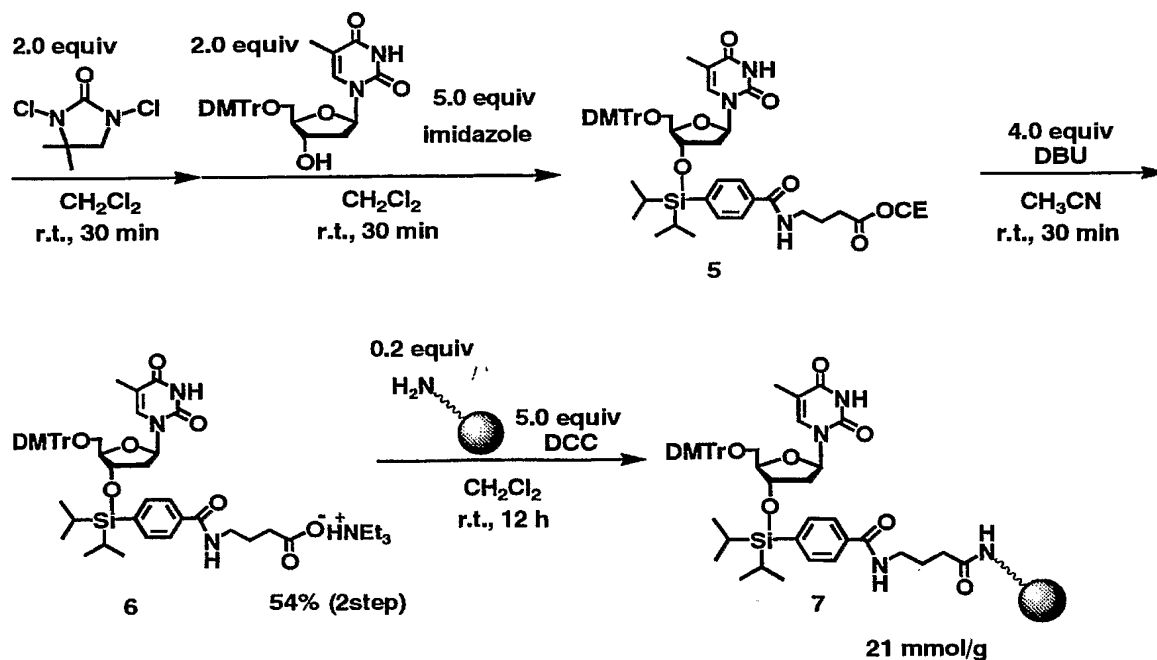
【0025】

【化1】



【0026】

【化2】



## 【0027】

## 実施例3: シリルリンカーを用いたDNA合成

一部のシトシン塩基部位のアミノ基がアセチル化されたDNA 13量体 $d[GC^{ac}ATCAGC^{ac}C^{ac}TCAT]$ の合成をおこなった。尚、このアセチル基はアンモニア程度の弱い塩基性条件下である。しかし、このアセチル化されたシトシン塩基はグアニン塩基とワトソン-クリック型の塩基対を形成でき、これを含むDNAオリゴマーは天然型のシトシン塩基より二重鎖形成能が高いという特殊な性質をもっている。

## 【0028】

DNAオリゴマーの自動合成機による合成は、HCP固相担体7 ( $1\mu\text{mol}$ ,  $21\mu\text{mol/g}$ )をApplied Biosystem Inc. (ABI) のDNA/RNA Synthesizer 392に用いておこなった。合成各鎖伸長サイクルは、以下の表に示すとおりである。

## 【0029】

【表1】

Step	operation	Reagent(s)	time, (min)
1	washing	$\text{CH}_3\text{CN}$	0.2
2	detritylation	3% $\text{Cl}_3\text{CCOOH}$ / $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	1.5
3	washing	$\text{CH}_3\text{CN}$	0.4
4	coupling	0.1M amidite + 0.2M $\text{HO}^t\text{Bt}$ in $\text{CH}_3\text{CN-NMP}$ (15:1, v/v)	1.0
5	washing	$\text{CH}_3\text{CN}$	0.2
6	coupling	0.1M amidite + 0.2M $\text{HO}^t\text{Bt}$ in $\text{CH}_3\text{CN-NMP}$ (15:1, v/v)	1.0
7	washing	$\text{CH}_3\text{CN}$	0.2
8	oxidation	0.1M $\text{I}_2$ in $\text{Py-H}_2\text{O-THF}$ (20:2:78, v/v/v)	0.5
9	washing	$\text{CH}_3\text{CN}$	0.4

## 【0030】

続いて、DMTr基を1分間の3% trichloroacetic acid in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL)で除去し、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 mL x 3),  $\text{CH}_3\text{CN}$  (1 mL x 3)で固相担体を洗浄した。その後、10% DBU in  $\text{CH}_3\text{CN}$  (500  $\mu\text{L}$ )でシアノエチル基を除去した。 $\text{CH}_3\text{CN}$  (1 mL x 3)で固相担体を洗浄した後に、TBAF (131 mg, 0.5 mmol)と酢酸 (24  $\mu\text{L}$ , 0.5 mmol)を無水THF 500  $\mu\text{L}$ に溶かした反応溶液で固相担体を1時間処理し、DNAオリゴマーの切り出しを行った。得られた混合溶液をSep-Pak C18カートリッジを用いて、脱塩後、さらに水で希釈し、逆相・陰イオン交換HPLCを用いて解析をした。得られた化合物の質量分析に結果は以下のとおりである： $d[GC^{ac}ATCAGC^{ac}C^{ac}TCAT]$ , Mass (M-H) calcd 4017.72, found 4018.00。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0031】

本発明のシリルリンカー又は3'末端ヌクレオシドユニットを用いることによって、塩基性で不安定な様々な機能をもつ官能基をもつDNA誘導体の合成できるようになる。

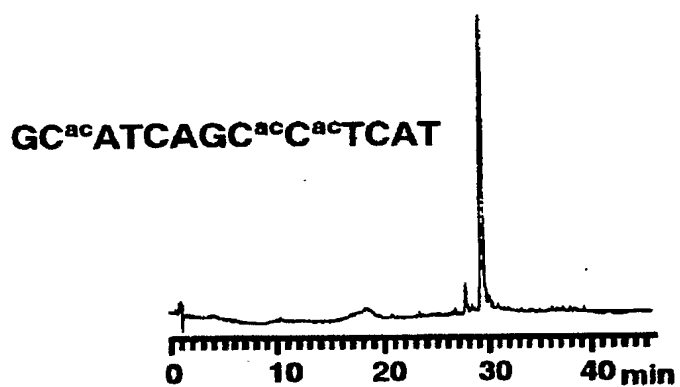
## 【図面の簡単な説明】

## 【0032】

【図1】シリルリンカーを用いて合成した $d[GC^{ac}ATCAGC^{ac}C^{ac}TCAT]$ の逆相・陰イオン交換HPLCのチャートを示す。

【書類名】 図面

【図 1】

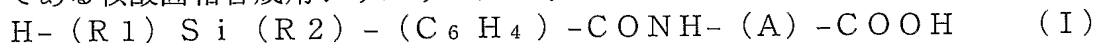


【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 DNA等の核酸オリゴマー合成に使用する固相担体に効率よく導入できるシリルリンカーを開発すること。

【課題を解決するための手段】 以下の一般式（I）で示される化合物又はその塩若しくはである核酸固相合成用シリルリンカー：



（式中、R1及びR2は、アルキル基又はアリール基であり、（A）はスペーサー部位を示す）。

【解決手段】

【選択図】 図1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 4 - 0 4 9 3 0 3
受付番号	5 0 4 0 0 3 0 1 6 3 2
書類名	特許願
担当官	第七担当上席 0 0 9 6
作成日	平成 1 6 年 2 月 2 6 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成16年 2月25日

特願 2 0 0 4 - 0 4 9 3 0 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 0 3 3 6 0 1 1 5 ]

1. 変更年月日 2 0 0 3 年 1 0 月 1 日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号  
氏 名 独立行政法人 科学技術振興機構
2. 変更年月日 2 0 0 4 年 4 月 1 日  
[変更理由] 名称変更  
住 所 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号  
氏 名 独立行政法人科学技術振興機構